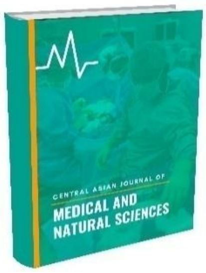
CENTRAL ASIAN JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES



Volume: 03 Issue: 04 | Jul- Aug 2022 ISSN: 2660-4159

http://cajmns.centralasianstudies.org

Создание Экспериментальной Модели Панкреонекроза

1. **Ш. К Атаджанов**
2. **Г. К Сапарбаева**

Received 5th Jun 2022,
Accepted 6th July 2022,
Online 9th Aug 2022

[1, 2] Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи г.Ташкент. Узбекистан

Аннотация: Острый панкреатит является потенциально тяжелым воспалительным заболеванием, которое может быть связано со значительной заболеваемостью и смертностью. В настоящее время специфического лечения заболевания не существует, что указывает на постоянную потребность в исследованиях его патогенеза и разработке новых терапевтических стратегий. Из-за непредсказуемого течения острого панкреатита и относительно скрытой анатомической локализации в забрюшинном пространстве исследование поджелудочной железы человека остается сложной задачей. В результате за последние 100 лет исследования патогенеза этого заболевания в значительной степени опирались на модели животных. Этот обзор обобщает различные модели острого панкреатита у животных. В нем указаны ключевые исследования, которые расширили наше текущее понимание патогенеза острого панкреатита, и подчеркивается важная роль животных моделей в трансляционных исследованиях для разработки новых методов лечения.

Ключевые слова: острый панкреатит, панкреонекроз, животные модели, ацинарные клетки поджелудочной железы, звездчатые клетки поджелудочной железы, клетки протоков поджелудочной железы, экспериментальное исследование.

В последние годы заболеваемость острым панкреатитом (ОП) во всем мире увеличилась и колеблется в зависимости от региона от 4,9 до 73,4 (в среднем 34) случаев на 100 тыс. во всем мире. Панкреонекроз (ПН) — это диффузное поражение или формирование очагов нежизнеспособной паренхимы поджелудочной железы, обычно сопровождающееся некрозом перипанкреатической жировой клетчатки. Панкреонекроз является одним из тяжелых форм острого панкреатита и встречается у 15-25% больных [1].

Общая летальность в настоящее время при ОП составляет 2 -8,9%, а при деструктивных формах -20 - 45%, и за последние 30 лет в нашей стране и за рубежом уровень летальности не изменяется [4].

За более чем 100 летнюю историю работ, посвященных экспериментальному изучению ОП, накоплен достаточный опыт, позволяющий воссоздать острую, хроническую и рецидивирующую формы заболевания. В патогенезе ОП остается большое количество нерешенных вопросов, в связи с этим экспериментальные исследования в указанном направлении не утратили своей актуальности.

В настоящее время наиболее востребованными являются следующие модели ОП: окклюзия петли двенадцатиперстной кишки; безхолиновая диета, дополненная этионином; перевязка билиопанкреатического протока; инъекция церулеина; перфузия биолиопанкреатического протока; введение алкоголя; перфузия биолиопанкреатического протока и одномоментная гиперстимуляция церулеином [5,6,7,8,9,10].

Каждая из вышеописанных моделей имеет свои недостатки, но и не лишена преимуществ. Все это необходимо учитывать перед планированием исследования и, тем более, при интерпретации полученных результатов. В зарубежных исследованиях наиболее часто встречается церулеиновая модель. Данная модель менее инвазивны и успешно используется при изучении ОП и для разработки методов его лечения.

Церулетид (синтетический аналог холецистокинин-панкреозамина), также известный как церулеин, представляет собой олигопептид из десяти аминокислот, который стимулирует гладкую мускулатуру и увеличивает пищеварительную секрецию. Стимулирует желудочную, желчную и панкреатическую секрецию, и некоторые гладкие мышцы.

Церулеин активирует белки межклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM-1) ацинарных клеток поджелудочной железы посредством внутриклеточной активизации NF-кВ. Поверхностный ICAM-1, в свою очередь, способствует адгезии нейтрофилов к ацинарным клеткам, усиливая воспаление поджелудочной железы [2]. Помимо стимулирования воспалительной клеточной реакции на ацинарные клетки, церулетид вызывает панкреатит за счет нарушения регуляции выработки пищеварительных ферментов и вакуолизации цитоплазмы, что приводит к гибели ацинарных клеток и отеку поджелудочной железы. Церулетид также активирует НАДФН-оксидазу, источник активных форм кислорода, способствующих воспалению [3)». Кишечник и печень. 2 (2): 74–80. doi (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Doi_(identifier)): 10.5009/gnl.2008.2.2.74.].

Цель исследования: оценить существующие модели ОП у крыс, основанные на внутрибрюшинном введении церулеина с комбинацией выпаивания алкоголя, а также создание механической модели путем перевязки билиопанкреатического протока. На основании проведенного анализа создать собственную модель острого некротического панкреатита (ОНП), характеризующуюся массивным выбросом цитокинов в периферический кровоток.

Материалы и методы. Эксперименты in vivo были проведены на базе экспериментальной лаборатории РНЦЭМП. Для выполнения экспериментальной работы на животных получено разрешение этического комитета от 20 мая 2021г, протокол №3/2-1518. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, предусмотренных «Об охране и использовании животного мира», Глава 5 Статья 31: «Использование объектов животного мира для медицинских, санитарно-эпидемиологических и ветеринарных целей», утвержденных в законе Республики Узбекистан от 26 декабря 1997 года № 545-I. Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по выведению из опыта и эвтаназии.

Содержание животных осуществлялось при температуре 18 - 20,5°C, обеспечивался свободный доступ к воде и пище. Эксперименты проведены на зрелых белых крысах-самцах. Возраст зрелых животных составляет 6-8 месяцев, масса – 250±50 г. Проведение экспериментальных исследований связано с необходимостью выполнения поставленной задачи – оценки морфофункциональных изменений поджелудочной железы при её повреждении. Для реализации данной задачи необходимо моделирование патологии поджелудочной железы, определение лабораторных показателей крови, морфометрических показателей, что требует проведения инвазивных вмешательств.

Церулеиновую модель (n=10 крыс) создавали путем внутрибрюшинного введения раствора церулеина в дозе 50 мкг/кг массы животного, дополнительно для потенцирования эффекта алкогольной модели производили выпаивание животных 10% раствором этилового спирта вместо питьевой воды (в течение 7 суток).

Механическую модель создавали путем формирования неполного стеноза общего желчного протока (n=10 крыс). С целью создания гипертензии в билиарной системе произведена перевязка общего желчного протока ниже впадения панкреатического протока, непосредственно у стенки двенадцатиперстной кишки. В качестве дополнительного фактора агрессии производили травматизацию, путем повреждения ткани поджелудочной железы в области головки с помощью сдавления между браншами пинцета до образования в данной зоне гематомы. Далее операция завершалась ушиванием операционной раны. Двум оперированным животным также однократно вводили раствор церулеина в дозе 30мкг/кг. Контрольную группу составляли 10 здоровых крыс.

Всем животным после эксперимента, для предотвращения гипогликемической комы, подкожно инъецировали по 5 мл 10%-ой глюкозы. Интраперитонеальные и подкожные инъекции были выполнены 1мл шприцом с размером иглы 27G.

Эвтаназию экспериментальных животных осуществляли помещением их в CO_2 -камеру с последующим обескровливанием. Кровь забирали для исследования уровней диастазы, АЛТ и АСТ. После этого осуществляли забор внутренних органов для морфологического исследования. Поджелудочную железу извлекали целиком и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином и исследовали методом световой микроскопии.

Результаты и обсуждения. С 1-й по 7-е сутки оценку общего состояния проводили на основании ежедневного контроля массы тела и клинических признаков, основанных на полуколичественной трехстепенной оценочной системе: активный (+++), слабый (++) и умирающий (+). Регистрировали выпадение волос, их блеск, желтушность кожных покровов и общую слабость, отказ от приема пищи. Клиническая характеристика животных указана в табл.1.1.

Таблица 1.1 - Клиническая характеристика испытуемых крыс n=20

Показатели	Время наблюдения (сутки)				
	1-е	3-е	5-е	7-е	10-е
Поведение	+++	+++	++	++	++
Характер изменения шерсти и кожных покровов	Блестящий, светло-серый	Блестящий, светло-серый	Тусклый светло-серый	Тусклый светло-серый	Тусклый светло-серый
Рвота раз/сутки	Нет	нет	2-3 раза в	4-5 раз в	4-5 раз в

			стуки	сутки	сутки
Цвет мочи	Светло желтый	Светло желтый	Светло желтый	Светло желтый	Темно желтый
Выживаемость	5	5	5	5	4

При этом у всех экспериментальных животных мы наблюдали снижение активности, появление тусклости шерсти, рвоты, что свидетельствовало о наличии интоксикации у данных крыс. Три крысы умерли на 3-5-е сутки.

Биохимические параметры крови исследовали с помощью реактивов на анализаторе «Vitros» (Япония). Для проведения биохимических исследований в динамике развития заболевания у крыс проводили забор крови на 7-ые сутки. Результаты указаны в табл1.2.

Таблица 1.2. - Динамика биохимических показателей у крыс

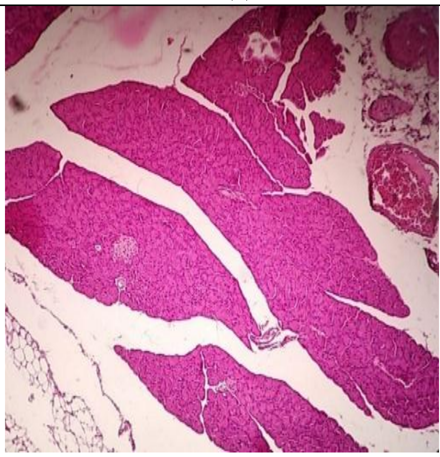
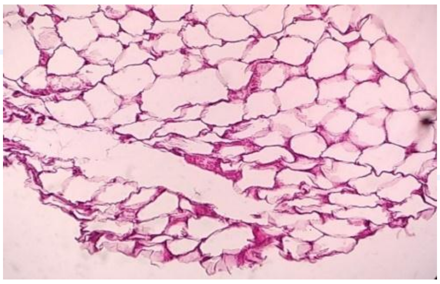
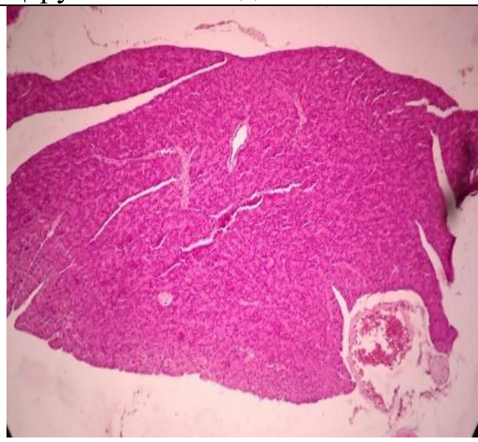
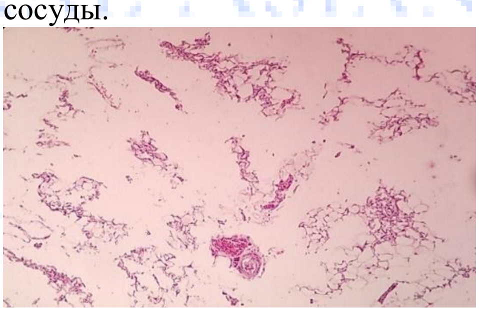
Показатели	**Нормы в системе СИ**	**Контрольная группа**	**Группы крыс с панкреонекрозом**	
			Механическая модель	**Церулеиновая модель**
Билирубин: Общий Прямой	8,55-20,5 мкмоль/л 25% от общего	11,87±0,55 abs	11,0±1,0 abs	16,5±2,5 3,0±1,0
Диастаза в крови:	0-100 л/с	55,0±5,0	1062,5±257,5	595,5±156,5
АСТ	0-37 u/л	39,51±5,67	225,0±14,9	110,0±37,0
АЛТ	0-42 u/л	25,20±3,19	127,0±10,0	77,5±26,5

При анализе биохимических показателей у крыс с механическим методом создания панкреонекроза, обращало на себя внимание практически двукратное превышение уровня диастазы крови 1062,5±257,5. Показатели трансаминаз (АЛТ, АСТ) крови также существенно увеличились (АСТ 225,0±14,9; АЛТ 127,0±10,0 u/л).

Таким образом, по данным биохимических анализов у животных отмечались признаки панкреатита и токсического гепатита в виде значительного повышения показателей печеночных ферментов и диастазы при этом уровень данных показателей были намного выше чем при использовании изолированного церулеина.

На 7-ые сутки экспериментальным животным в условиях общей анестезии выполнялось релапаротомия. Выполнена ревизия органов брюшной полости, путем тракции и выведения в операционную рану двенадцатиперстной кишки и селезенки. При этом у крыс с механическим методом отмечается серозная мутная воспалительная жидкость, поджелудочная железа умеренно увеличенная, плотная, покрыт множественными стеариновыми бляшками. Ткань поджелудочной железы полнокровная, с очагами кровоизлияний вокруг мелких сосудов. Для анализа обзорной гистологической картины и морфологического анализа взята кусочек от внутренних органов брюшной полости (легкие, печень, поджелудочная железа) с помещением их в 10% растворе формалина. Характеристики морфологических срезов (микроскопия) у крыс указаны в табл.1.3.

Таблица 1.3. - Характеристика срезов (микроскопия)

Органы:	Характеристика срезов:	
	Механическая модель	Церулеиновая модель
Поджелудочная железа	 Рисунок 1. Срез поджелудочной железы. Ткань поджелудочной железы с сохранением структуры, резко выраженным межуточным отеком, полнокровием сосудов  Рисунок 2. Срез поджелудочной железы. В парапанкреатической жировой ткани- полнокровие сосудов	 Рисунок 3. Срез поджелудочной железы. Структура поджелудочной железы сохранена, отмечается незначительный межуточный отек, расширенные полнокровные сосуды.  Рисунок 4. Срез поджелудочной железы. В парапанкреатической клетчатке определяются аналогичные изменения: отек и полнокровие сосудов

В результате однократного введения церулеина в дозе 50 мкг/кг у крыс развивался интерстициальный отек паренхимы поджелудочной железы. При этом с увеличением дозировки препарат не усиливал степень выраженности воспаления, очаги некроза не выявляли.

При анализе данных патоморфологии животных, перенесших частичную перевязку общего желчного протока видно, что в отличие от церулеиновой модели в поджелудочной железе превалировали некротические процессы. Структура ткани поджелудочной железы подвергалась значительным дистрофическим изменениям, выразившимся резко выраженным межуточным отеком и полнокровие сосудов в парапанкреатической жировой ткани. (рисунки 1,2). Имелись признаки выраженного воспаления в ткани поджелудочной железы - отек, инфильтрация макрофагами и лейкоцитами. Три крысы погибли. На аутопсии было выяснено, что причиной

смерти у всех животных явился тотальный некроз поджелудочной железы. К сожалению, у погибших животных забор крови на биохимическое исследование произвести не удалось.

Вывод и заключения. Тенденции развития экспериментальной науки обусловлены наличием нерешенных проблем в современной хирургии. Одна из таких проблем — отсутствие снижения показателя летальности от ОП, наблюдаемое в течение последних десятилетий. Основное количество летальных исходов связано с полиорганной недостаточностью в начальной фазе заболевания или с осложнениями инфицированного ПН.

Для экспериментального исследования первой стадии ОП с синдромом системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточностью необходимо создание модели с обширной деструкцией ткани ПЖ и наличием системных проявлений. Анализ литературы показывает, что модели перфузии билиопанкреатического протока у крыс приводят к соответствующим морфологическим изменениям ПЖ и показателям летальности, сопоставимым с таковыми в человеческой популяции.

Для изучения поздних инфекционных осложнений ОП оптимальными являются модели с низким уровнем летальности и сохранением условий для бактериальной транслокации. Наиболее эффективной является модель с окклюзией просвета двенадцатиперстной кишки. При анализе результатов необходимо учитывать, что в данных моделях происходит рефлюкс микроорганизмов через билиопанкреатический проток.

Что касается исследования новых терапевтических стратегий, то в эксперименте лечение начинается сразу после индукции ОП. По этой причине интерпретировать данные результаты достаточно сложно. С другой стороны, у грызунов течение ОП более стремительное, чем у человека, и поэтому «терапевтическое окно» (возможность эффективной терапии до появления осложнений) значительно уже, что может привести к ложноотрицательному результату исследования.

Многие модели ОП в настоящее время утратили свою актуальность. Современные методики основаны на базовых принципах, проистекающих из известных нам основ патогенеза данного заболевания. Несмотря на это, идеальная модель ОП, с помощью которой можно было бы оценить патофизиологию осложнений, возможность лечения и профилактики, еще не найдена. Каждая из вышеприведенных моделей имеет свои недостатки, но и не лишена преимуществ. Это необходимо учитывать перед проектированием исследования и при интерпретации полученных результатов.

В результате проведенной серии экспериментальных исследований было установлено, что однократное внутрибрюшинное введение церулеина в дозе 50 мкг/кг у крыс вызвал умеренный отечный панкреатит. Выпаивание 10% раствора этилового спирта на протяжении 7- суток у всех крыс приводило к развитию острого отечного панкреатита. Патоморфологический анализ поджелудочной железы этих животных выявил интерстициальный отек различной степени, инфильтрацию долек макрофагами и частичный некроз части паренхимы, который характеризовался (в зависимости от степени поражения) потерей гранул зимогена, деградаций части ацинусов, образованием на месте разрушенных ацинусов округлых пустот.

Неполный механический стеноз общего желчного протока привел к развитию панкреонекроза различной степени выраженности. Однократная внутрибрюшинная инъекция церулеина в дозе 30 мкг/кг оперированным животным увеличивала степень деструкции ткани поджелудочной железы. Данная модель характеризовалась статистически значимым усилением секреции про- и противовоспалительных цитокинов.

Таким образом, механическая модель панкреонекроза у крыс может быть рекомендована для

исследований новых стратегий лечения.

Литература

1. Филин В.И.,Костюченко A.JL, 1994; Савельев В.С. и соавт., 2000; 2001; Heiy H. A. et al., 1985; Banks P. A., 1991;Beger H. G.,1991; Bradley E. L., 1991; Kaufmann P. et al., 1996; Jonson C. H., Imrie C. W., 1992;1999.
2. Занинович В., Гуковская А.С., Гуковский И., Мурия М., Пандол С.Дж. (октябрь 2000 г.). «Церулеин активирует ICAM-1 в ацинарных клетках поджелудочной железы, что опосредует адгезию нейтрофилов к этим клеткам (http://ajpgi.physiology.org/content/279/4/G666.full.pdf+html)». Американский журнал физиологии. Физиология желудочно-кишечного тракта и печени. 279 (4): G666-76. doi (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Doi_(identifier));10.1152/jpgi.2000.279.4.G666https://doi.org/10.1152%2Fajpgi.2000.279.4.G666). PMID (https://en.m.wikipedia.org/wiki/PMID_(identifier)) 11005752 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11005752)].
3. Ким Х (сентябрь 2008 г.). «Церулеиновый панкреатит: окислительный стресс, воспаление и апоптоз (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871591)». Кишечник и печень. 2 (2): 74–80. doi (https://en.m.wikipedia.org/wiki/Doi_(identifier)): 10.5009/gnl.2008.2.2.74.
4. Толстой А.Д., 1997; 2001; Решетников Е. А. и соавт., 1998; Вашетко Р.В. и соавт., 2000; Lankish P. et al., 1996; Buchler P., Reber H., 1999; Jonson C. H., Imrie C. W., 1999; Wyncoll D. L., 1999.
5. Armstrong C.P., Taylor T.V., Torrance H.B. Effects of bile, infection and pressure on pancreatic duct integrity. Br. J. Surg., 1985; 72(10): 792–795.
6. Lampel M., Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol., 1977; 373(2): 97–117.
7. Lombardi B. Influence of dietary factors on the pancreatotoxicity of ethionine. Am. J. Pathol., 1976; 84(3): 633–648.
8. Nevalainen T.J., Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. Scand. J. Gastroenterol., 1975; 10(5): 521–527.
9. Schmidt J., Rattner D.W., Lewandrowski K., Compton C.C., Mandavilli U., Knoefel W.T. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Ann. Surg., 1992; 215(1): 44–56.
10. Sheen-Chen S.M., Eng H.L., Hung K.S. Altered serum transforming growth factor-beta1 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in obstructive jaundice. World J. Surg., 2004; 28(10): 967–970.